

**Composé phosphocalcique modifié, composition injectable le
contenant**

L'invention concerne un composé phosphocalcique modifié par un composé gem-biphosphonique, un procédé pour sa
5 préparation, ainsi que son utilisation pour l'élaboration d'une composition injectable.

Le dérèglement de l'activité osseuse d'un individu est à l'origine de nombreuses pathologies osseuses telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget ou les tumeurs ostéolyti-
10 ques. Compte tenu notamment de l'augmentation de la longévité des personnes, l'ostéoporose est devenu un problème de santé publique et de nombreuses recherches ont été entreprises pour y remédier. Les pathologies osseuses considérées étant provoquées par un déséquilibre du remodelage osseux au profit
15 de l'activité des ostéoclastes, l'une des voies de traitement envisagée a consisté à diminuer l'activité des ostéoclastes, en vue de ralentir la dégradation de la matière osseuse.

Les recherches effectuées sur divers acides gem-biphosphoniques ont montré leur pouvoir inhibiteur de
20 l'activité des ostéoclastes (G. A. Rodan, et al., Therapeutic Approaches to Bone Diseases, 1 septembre 2000, vol. 289, Science, p.1508-1514). L'usage de certains d'entre eux comme médicament a été admis dans divers pays, notamment l'etidronate, le clodronate, le pamidronate, l'alendronate,
25 le risedronate, le tiludronate et l'ibandronate. Des données ont été publiées pour d'autres composés acides gem-biphosphoniques, notamment le zoledronate, l'incadronate, l'olpadronate, le neridronate. Les acides gem-biphosphoniques qui sont utilisés à ce jour pour le traitement de lésions
30 osseuses sont utilisés par voie systémique et génèrent de ce fait quelques effets secondaires indésirables. Ils peuvent provoquer des troubles rénaux lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse, et des troubles du système digestif, notamment des oesophagites ou des ulcères de l'estomac,
35 lorsqu'ils sont administrés par voie orale [(Lin J.H., Bone 1996 ; 18 ; 75-85) ou (Thiébauld D. et al., Osteoporosis Int 1994 ; 76-73)]. Un autre inconvénient de l'administration par

voie orale réside dans le faible taux d'absorption du principe actif sur la matière osseuse.

On connaît par ailleurs des compositions injectables destinées à former des substituts osseux. FR-2715853 décrit
5 des compositions pour bio-matériaux de résorption / substitution de tissus de soutien, comprenant une phase minérale composée de BCP ou de calcium-titane-phosphate, et une phase aqueuse liquide comprenant une solution aqueuse d'un polymère dérivé de la cellulose. Ces compositions injectables ne
10 contiennent aucun principe actif.

On connaît également des substituts osseux non injectables, qui se présentent sous forme d'implants. Par exemple, H. Denissen, et al (J. Periodontal, vol. 71, n°2, Février 2000, p. 280-296) décrit des implants d'hydroxy-
15 apatite modifiée par adsorption d'un acide gem-biphosphonique particulier, à savoir l'acide (3-diméthylamino-1-hydroxypropylidène)-1,1-biphosphonique ou olpadronate. La libération in situ de l'acide favoriserait la reconstruction osseuse. Cependant, l'hydroxyapatite elle-même présente l'inconvénient
20 d'être très faiblement résorbable.

Le but de la présente invention est de fournir une composition contenant un principe actif inhibant l'activité des ostéoclastes et qui puisse être administrée sans produire les effets secondaires liés à une administration par voie
25 systémique ou à l'utilisation d'un implant solide.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un composé phosphocalcique modifié, un procédé pour sa préparation, ainsi que son utilisation comme principe actif dans une composition injectable.

30 Le composé phosphocalcique modifié selon la présente invention peut être obtenu en ajoutant un acide gem-biphosphonique ou l'un de ses sels de métal alcalin ou alcalino-terreux à une suspension d'un composé phosphocalcique précurseur dans l'eau ultra-pure, en agitant le milieu réactionnel
35 à température ambiante, puis en récupérant par centrifugation le composé formé. Le composé peut être ensuite purifié par lavage à l'eau ultra-pure, suivi d'une filtration et d'un séchage à l'air à température ambiante. Le composé phosphocalcique précurseur est choisi parmi les orthophosphates de

calcium ayant une solubilité dans l'eau supérieure à 4.10^{-59} mol.l⁻¹. A titre d'exemple, on peut citer les BCP qui sont un mélange d'hydroxyapatite et de phosphate tricalcique β (généralement désigné par β -TCP) en proportions variables, 5 le CDA qui est une hydroxyapatite déficiente en calcium (obtenue par exemple par hydrolyse alcaline d'un orthophosphate de calcium acide), et le β -TCP.

Par eau ultra-pure, on entend dans ce texte une eau ayant une résistivité voisine de 18 M Ω cm.

10 L'agitation à température ambiante est maintenue de préférence pendant une durée entre 1 h et 72 h, par exemple pendant 48 heures. La nature de l'agitation et la granulométrie du composé phosphocalcique précurseur ont un effet sur la proportion de composé gem-biphosphonique qui peut être 15 greffé. Il est donc préférable, lorsqu'une granulométrie donnée a été choisie pour le composé phosphocalcique précurseur, d'adapter l'agitation de sorte à ne pas modifier ladite granulométrie.

Les acides ou les sels qui peuvent être utilisés comme 20 composés gem-biphosphoniques répondent à la formule (OY)(OX)P(O)-CR¹R²-P(O)(OX)(OY) dans laquelle X ou Y représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux, R¹ représente H, OH ou un halogène, et R² représente :

- 25
- un hydrogène ou un halogène,
 - un radical alkyle,
 - un radical aminoalkyle dans lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant alkyle,
 - un radical alkylamino,

30

 - un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N,
 - un radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

Lorsque R¹ et/ou R² représentent un halogène, Cl est particulièrement préféré.

35 Lorsque R² est un radical alkyle, on préfère les alkyles ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

Lorsque R² est un radical aminoalkyle, on préfère les radicaux NH₂(CH)_n- dans lesquels n est inférieur à 6.

Lorsque R^2 est un radical alkylaminoalkyle, on préfère les radicaux $R'R''N(CH_2)_m-$ dans lesquels R' et R'' représentent indépendamment l'un de l'autre H, ou un radical alkyle ayant au plus 5 atomes de carbone, et m est inférieur à 6.

5 Lorsque R^2 est un radical alkylamino, on préfère les radicaux R^cNH- dans lesquels R^c est un cycloalkyle ayant de 3 à 7 atomes de carbone.

Lorsque R^2 est un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N, on préfère les
10 alkyles ayant au plus 3 atomes de carbone et portant un groupe pyridinyle ou imidazoyle.

Lorsque R^2 est un radical alkyle portant un groupe thio-éther aromatique, on préfère les alkyles ayant au plus 3 atomes de carbone et portant un groupe phénylthio dans lequel le
15 groupe phényle porte éventuellement un substituant halogène.

Parmi ces composés gem-biphosphoniques, on peut citer :

- l'étidronate ($R^1 = OH$, $R^2 = CH_3$),
- le clodronate ($R^1 = Cl$, $R^2 = Cl$),
- le pamidronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2CH_2NH_2$),
- 20 • l'alendronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -(CH_2)_3NH_2$),
- le risedronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2-3-pyridine$),
- le tiludronate ($R^1 = H$, $R^2 = -CH_2-S-C_6H_4-Cl$),
- l'ibandronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2-CH_2-N(CH_3)pentyle$),
- le zoledronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -CH_2-imidazole$),
- 25 • l'incadronate ($R^1 = H$, $R^2 = -NH-(cycloheptyle)$),
- l'olpadronate ($R^1 = OH$, $R^2 = CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$),
- le neridronate ($R^1 = OH$, $R^2 = -(CH_2)_5NH_2$).

Les acides dans lesquels R^2 est un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un
30 atome N, tels que le zoledronate ou le risedronate, sont particulièrement préférés.

Un composé phosphocalcique modifié selon l'invention est caractérisé par la composition chimique suivante :

$Ca_{(10-a)}(Mg, K, Na)_b(PO_4)_{6-c}(HPO_4, CO_3)_d(OH)_{2-e}(F, Cl, CO_3)_f$
35 $[(OA)(OE)P(O)-CR^1R^2-P(O)(OA)(OE)]_g$, dans laquelle A et E représentent H, un métal alcalin, un métal alcalino-terreux ou néant, et où R^1 et R^2 ont la signification donnée ci-dessus, et $0 < a < 9$; $0 < b < 2$; $0 < c < 5$; $0 < d < 2$; $0 < e < 2$; $0 < f < 2$; $g < 0,5$. Lorsque A ou E représente H, l'atome d'oxygène qui le

porte n'est pas lié à la matrice phosphocalcique ou il lui est simplement associé par liaison hydrogène. Lorsque A ou E est "néant", l'atome d'oxygène qui le porte est coordonné à un autre élément de la composition, par exemple à un Ca.

5 La teneur en acide gem-biphosphonique d'un composé phosphocalcique modifié peut être déterminée par spectroscopie UV-visible selon la méthode décrite par Ames, B.N., notamment dans *Methods in Enzymology*, Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Eds., Academic Press, Orlando, 1966, vol. 8, pp. 115-118.

10 Elle peut en outre être déterminée par RMN liquide ^{31}P . La caractérisation du composé phosphocalcique modifié peut être effectuée essentiellement par la RMN du solide ^{31}P MAS qui montre à la fois la présence du support phosphocalcique et celle du principe actif.

15 Un autre objet de l'invention est une composition utilisable par injection pour le traitement d'ostéoporose ou de récurrences de tumeurs lytiques par inhibition de l'activité ostéoclastique. Ladite composition est une suspension du composé phosphocalcique modifié défini ci-dessus dans une

20 solution ou un gel biocompatible présentant une viscosité permettant le transport de granules de taille comprise entre 40 μm et 500 μm . A titre d'exemple, on peut citer les hydrogels d'intérêt biologique décrits dans Chem. Rev. (2001) ; 101(7) : 1869-1879, notamment les hydrogels dérivés

25 de la cellulose ou à base d'hyaluronate de sodium.

Le choix du diamètre particulaire est guidé par la cinétique de résorption d'une part et la rhéologie à l'injection d'autre part. Les particules de diamètre inférieur à 40 μm présentent une cinétique de biorésorption

30 trop rapide et les particules de diamètre supérieur à 500 μm présentent des problèmes de rhéologie à l'injection. Il est toutefois entendu qu'une faible proportion de particules (jusqu'à 10% en volume) peut avoir un diamètre inférieur à 40 μm ou supérieur à 500 μm . Une composition injectable selon

35 l'invention contient de préférence de 40 % à 75 % en masse de composé phosphocalcique modifié, de 60 % à 25 % en masse d'hydrogel, et éventuellement divers additifs. Les additifs sont choisis parmi les composés capables d'introduire divers

ions d'intérêt biologique tels que par exemple : K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- ou Cl^- .

La composition peut être préparée en mettant en suspension dans le milieu approprié le composé phosphocalcique modifié préparé dans une étape préliminaire. Il peut en outre être préparé en précipitant le composé phosphocalcique modifié in situ, à partir d'un hydrogel défini comme précédemment et préalablement chargé en ions phosphates (respectivement calcium) dans lequel sera ajoutée une solution appropriée contenant des ions calcium (respectivement phosphates) et la concentration souhaitée en acide biphosphonique.

Le mode d'association entre la matrice phosphocalcique et l'acide biphosphonique est différent suivant la matrice phosphocalcique utilisée, et cette différence se traduit par une efficacité biologique différente lors de tests *in vitro* sur des cultures d'ostéoclastes.

La composition selon l'invention, sous forme injectable, permet de traiter localement un problème osseux sur les principaux sites à risques identifiés (col du fémur et corps vertébraux), à l'aide d'un principe actif connu pour son utilisation par voie systémique qui présente divers inconvénients rappelés précédemment. En outre, la phase phosphocalcique, qui joue le rôle de vecteur du principe actif, exerce un effet complémentaire en ce sens qu'elle permet de maintenir l'acide gem-biphosphonique en place, et qu'elle constitue une source de calcium et de phosphate nécessaire pour la stimulation du remodelage osseux. L'hydroxyapatite (HA) décrite dans l'art antérieur comme matrice d'un implant imprégné d'un principe actif ne fait pas partie des composés phosphocalciques utilisables dans la présente invention, car elle a une solubilité relativement faible, elle possède intrinsèquement un caractère faiblement résorbable, et l'introduction d'acide gem-biphosphonique diminue le potentiel de résorbabilité des composés phosphocalciques de manière générale.

35

Les exemples

La présente invention est décrite plus en détail par les exemples suivants, qui sont donnés à titre d'illustration, mais auxquels l'invention n'est pas limitée.

Les composés et réactifs suivants ont été utilisés :

- eau ultra-pure : eau ayant une résistivité voisine de 18 MΩ cm
- zoledronate de sodium : acide gem biphosphonique commercialisé par la société Novartis
- tiludronate de sodium : acide gem biphosphonique commercialisé par la société Sanofi-Synthélabo
- CDA voie NaOH : hydroxyapatite déficiente en calcium obtenue par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté avec une solution aqueuse de NaOH), sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 µm)
- CDA voie ammoniacque (hydroxyapatite déficiente en calcium obtenue par hydrolyse de phosphate dicalcique dihydraté avec de l'ammoniaque), sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 µm
- β-TCP, sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 µm.
- BCP (75% β-TCP / 25% HA) sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 µm
- BCP (25% β-TCP / 75% HA) sous forme de granules ayant une granulométrie entre 40-80 µm.

Exemple 1

Préparation d'un composé phosphocalcique modifié

On a préparé une suspension de phosphate de calcium en introduisant 700 mg de BCP ayant une granulométrie de 40-80 µm, dans 3,5 ml d'eau ultra-pure, et on a ajouté 56 mg (0,14 mmol) de zoledronate. On a placé la suspension dans un tube maintenu à température ambiante, et on a agité par un agitateur rotatif à 16 tr/min pendant 48 h. Ensuite, on a centrifugé la suspension et on a séparé le culot du surnageant.

La phase solide a ensuite été lavée plusieurs fois avec de l'eau ultra-pure, puis filtrée et séchée à température ambiante.

Le procédé a également été mis en œuvre à partir des composés phosphocalciques suivants : CDA voie NaOH, CDA voie ammoniacque et β-TCP.

Caractérisation des composés phosphocalciques modifiés

La quantité de zoledronate incorporée dans chacune des matrices phosphocalciques a été déterminée par différence, en dosant la quantité de zoledronate présente dans le surnageant. Ce dosage a été effectué, sur la solution surnageante
5 séparée du culot après centrifugation, par RMN liquide ^{31}P à partir de courbes d'étalonnage préalablement établies. Il peut également être effectué par spectroscopie UV-visible selon la méthode précitée décrite par Ames.

10 Les résultats obtenus pour chacun des composés phosphocalciques précurseurs sont donnés dans le tableau ci-dessous. T (%) indique la teneur en zoledronate dans le produit final, exprimée en mg de principe actif pour 100 mg de composé phosphocalcique, et P (%) indique le pourcentage
15 de zoledronate fixé sur le composé par rapport à la quantité introduite dans le milieu réactionnel :

Précurseur	T (%)	P (%)
BCP (75% β -TCP / 25% HA)	1	13
BCP (25% β -TCP / 75% HA)	2,7	33
CDA voie NaOH	5,2	65
CDA voie ammoniacale	6,4	80
β -TCP	6,4	80

La figure 1 représente le spectre RMN liquide ^{31}P du surnageant obtenu après centrifugation du milieu réactionnel correspondant au précurseur CDA (voie NaOH). L'intégration
20 des signaux rend compte de l'abondance de chaque espèce et le déplacement chimique (caractéristique de l'espèce) est porté en abscisse. Le pic 1 représente la teneur en zoledronate, le pic 2 représente le phosphate relargué dans le milieu par le composé phosphocalcique et le pic 3 représente la référence
25 NaH_2PO_4 .

Le spectre RMN liquide ^{31}P des composés obtenus à partir des autres précurseurs (sauf l'hydroxyapatite) est analogue et l'on remarque dans tous les cas un relargage de phosphate en cours de réaction.

30 La caractérisation des solides obtenus montre deux modes d'association différents du zoledronate suivant la nature du

composé phosphocalcique de départ. La figure 2 représente une photographie par microscopie électronique à balayage (M.E.B.) effectuée sur le composé issu du β -TCP. Elle montre qu'une forme de zoledronate (probablement associée à du calcium) cristallise à la surface de la matrice phosphocalcique. Le même phénomène est observé dans le cas des BCP, qu'ils soient riches en β -TCP (75% β -TCP - 25% HA) ou pauvres en β -TCP (25% β -TCP - 275% HA).

Les données RMN du solide ^{31}P MAS sont représentées sur la figure 3 pour le composé issu du β -TCP. Le spectre 1 acquis en mode CP (Polarisation Croisée) permet d'observer sélectivement le zoledronate incorporé. Les signaux fins rendent compte de sa présence sous une forme cristalline. Le spectre 2 enregistré en mode découplage proton permet d'observer sélectivement le support β -TCP non altéré.

Le spectre RMN du solide ^{31}P CP-MAS est représenté sur la figure 4 pour le composé issu du CDA (voie ammoniacale). Le signal du zoledronate (pic 1) est très large. Aucune phase cristalline n'est détectée à la surface du matériau, ce qui indique probablement une chimisorption du zoledronate à la surface du CDA. Le pic 2 est caractéristique du CDA.

Exemple 2

Préparation de composés phosphocalciques modifiés par le tiludronate et l'acide méthylène biphosphonique

On a préparé une suspension de phosphate de calcium en introduisant 700 mg de β -TCP ayant une granulométrie de 40-80 μm , dans 3,5 ml d'eau ultra pure, et on a ajouté 52,5 mg (0,14 mmol) de tiludronate. On a placé la suspension dans un tube maintenu à température ambiante, et on a agité par un agitateur rotatif à 16 tr/min pendant 48 h. Ensuite, on a centrifugé la suspension et on a séparé le culot du surnageant.

La phase solide a ensuite été lavée plusieurs fois avec de l'eau ultra-pure, puis filtrée et séchée à température ambiante.

Une réactivité semblable à celle enregistrée avec le zoledronate est observée. La figure 5 montre le spectre RMN ^{31}P CP-MAS du β -TCP traité par le tiludronate. Le tiludronate

peut être observé sous forme d'une phase cristalline (massif 1 constitué de signaux fins) déposée sur la phase phosphocalcique (qui apparaît faiblement (massif 2) dans ces conditions d'enregistrement du spectre.

5

Exemple 3

Préparation d'une composition injectable

On a préparé une composition injectable à partir de chacun des composés modifiés obtenus dans les exemples 1 et 2, à l'exception des composés modifiés obtenus à partir
10 d'hydroxyapatite, selon le procédé suivant.

Pour chaque composé modifié, on a préparé des granules dont 95% en volume avaient un diamètre particulaire équivalent compris entre 40 et 80 μm , et on a introduit ces granules dans une solution aqueuse contenant 3%
15 d'hydroxypropylméthylcellulose comprenant 21% en masse de groupe méthyle et 8% en masse de groupe hydroxypropyle avec un degré de polymérisation égal à 110, de façon à obtenir une composition comprenant 49% en masse de granules.

Chacune des compositions ainsi préparées a été
20 introduite dans un flacon de verre et stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Exemple 4

Tests *in vitro* de phosphates de calcium modifiés

Des cellules osseuses totales, isolées à partir d'os
25 longs de lapins nouveaux-nés, ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de l'association du composé phosphocalcique modifié. Les performances du BCP modifié et du CDA voie ammoniacale modifié obtenus dans l'exemple 1 ont été mesurées et comparées avec celle du précurseur phosphocalcique
30 respectif non traité par l'acide gem-biphosphonique.

Pour chaque essai, on a chargé dans un premier puit de culture deux pastilles de dentine de cachalot (composé de référence pour la mesure de la résorption) et une pastille de composé phosphocalcique non traité, et dans un second puit de
35 culture, deux pastilles de dentine et une pastille de composé phosphocalcique traité en surface.

L'activité de résorption des ostéoclastes dans ces conditions de culture a été évaluée (après 5 jours) par trois paramètres différents :

- 1- Le nombre de total de lacunes formées à la surface de la dentine de cachalot
- 2- La surface moyenne des lacunes
- 3- La surface de dentine résorbée.

Il apparaît que :

- En présence de pastilles de BCP modifiées par 1 % de zoledronate en poids, l'activité de résorption résiduelle des cellules osseuses du modèle était indétectable. Ce phénomène serait lié à un relargage important de zoledronate ayant eu un effet cytotoxique. En effet, si l'on met du BCP ou du β -TCP modifié dans de l'eau, un pourcentage significatif du zoledronate chargé repasse rapidement en solution. Par exemple, 60 mg de β -TCP modifié mis en suspension dans 1 ml d'eau pendant 8 heures conduit au relargage d'environ 25 % du zoledronate chargé, soit une concentration molaire de 10^{-2} M.
- En présence de pastilles de CDA modifiées par 6,4 % de zoledronate en poids, l'activité de résorption des cellules était réduite d'environ 80 % par rapport au contrôle sans zoledronate. Comme dans le cas du β -TCP modifié, si l'on met en suspension 60 mg de CDA modifiée dans 1 ml d'eau pendant 8 heures, aucune trace de zoledronate n'est détectée (méthode UV-visible). Ceci implique que le zoledronate n'est potentiellement présent qu'à des concentrations inférieures à 10^{-4} M (limite de détection dans nos conditions d'analyse).

Ces résultats montrent que les performances du matériau résultent non pas de la seule quantité de zoledronate fixée sur la matrice phosphocalcique, mais aussi de la vitesse de relargage du zoledronate, et ils confirment un effet à distance de la matrice phosphocalcique modifiée.

Exemple 5

Plusieurs échantillons de CDA (200 mg) modifiée par ajout de zoledronate conformément au procédé de l'exemple 1 et plusieurs échantillons de CDA non modifiée ont été incubés

dans 5 ml de milieu de culture à 37 °C. Après 96 heures d'incubation, les différents surnageants ont été recueillis et utilisés purs, dilués 10, 100 et 1000 fois dans un modèle d'ostéoclastes de lapins.

5 Les résultats sont représentés sur la figure 6, sur laquelle le pourcentage de résorption R est indiqué en ordonnées, les conditions étant indiquées en abscisse. Parmi les conditions :

- "vehicule" signifie le milieu de culture seul
- 10 • "CDA pure" signifie le surnageant issu de l'incubation de CDA pure dans le milieu de culture ; "CDA1/10", "CDA1/100" et "CDA1/1000" signifient respectivement la solution désignée ci-dessus et diluée à 1/10, 1/100 et 1/1000.
- "zo pure" signifie une solution de zoledronate 10^{-6} M dans
15 le milieu de culture, "zo1/10", "zo1/100", "zo1/1000" signifient respectivement la solution désignée ci-dessus et diluée à 1/10, 1/100 et 1/1000.
- "CDAzo pure" signifie le surnageant issu de l'incubation de CDA chargée en zoledronate dans le milieu de culture
20 "CDAzo1/10", "CDAzo1/100" et "CDAzo1/1000" signifient respectivement la solution désignée ci-dessus et diluée à 1/10, 1/100 et 1/1000.

Ces résultats montrent que :

- le zoledronate libéré par la phase phosphocalcique
25 (CDAzo) conserve son activité inhibitrice de la résorption ostéoclastique avec un effet dose marqué,
- la CDA seule ne semble pas influencer la résorption ostéoclastique quelle que soit la dilution du surnageant, 1
- le zoledronate en solution (zo) conserve son activité
30 biologique et inhibe selon une relation dose/effet la résorption.

La comparaison des profils d'inhibition de la résorption ostéoclastique provoquée par l'association CDA/Zo et par le zoledronate seul (solution 10^{-6} M utilisée pure, diluée 10,
35 100 et 1000 fois) permet de suggérer que le matériau libère une quantité de zoledronate correspondant à une concentration de l'ordre de 10^{-6} M.

Revendications

1. Composé phosphocalcique caractérisé en ce qu'elle présente la composition chimique suivante :

$$\text{Ca}_{(10-a)} (\text{Mg}, \text{K}, \text{Na})_b (\text{PO}_4)_{6-c} (\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_d (\text{OH})_{2-e} (\text{F}, \text{Cl}, \text{CO}_3)_f$$

$$[(\text{OA})(\text{OE})\text{P}(\text{O})-\text{CR}^1\text{R}^2-\text{P}(\text{O})(\text{OA})(\text{OE})]_g,$$
 dans laquelle $0 < a < 9$;
5 $0 < b < 2$; $0 < c < 5$; $0 < d < 2$; $0 < e < 2$; $0 < f < 2$; $g < 0,5$, A et E
représentent H, un métal alcalin, un métal alcalino-terreux ou néant, R^1 représente H, OH ou un halogène et R^2 représente
un élément choisi parmi un hydrogène, un halogène, un radical
alkyle, un radical aminoalkyle dans lequel le groupe amino
10 porte éventuellement un substituant alkyle, un radical
alkylamino, un radical alkyle portant un substituant
aromatique comprenant au moins un atome N, un radical alkyle
portant un groupe thioéther aromatique.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
15 que R^1 et/ou R^2 représentent Cl.

3. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que R^2 est un radical ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

4. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que R^2 est un radical aminoalkyle $\text{NH}_2(\text{CH})_n-$ dans lequel n est
20 inférieur à 6.

5. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que R^2 est un radical alkylaminoalkyle $\text{R}'\text{R}''\text{N}(\text{CH}_2)_m-$ dans
lequel R' et R'' représentent indépendamment l'un de l'autre H
ou un radical alkyle ayant au plus 5 atomes de carbone, et m
25 est inférieur à 6.

6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que R^2 est un radical alkylamino $\text{R}^c\text{NH}-$ dans lequel R^c est un
cycloalkyle ayant de 3 à 7 atomes de carbone.

7. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
30 que R^2 est un radical alkyle ayant au plus 3 atomes de
carbone et portant un groupe pyridinyle ou imidazole.

8. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que R^2 est un radical alkyle ayant au plus 3 atomes de
carbone et portant un groupe phénylthio dans lequel le groupe
35 phényle porte éventuellement un substituant halogène.

9. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce
que R^1 est OH, R^2 est $-\text{CH}_2$ -imidazole, A et E représentent H.

10. Procédé de préparation d'un composé phosphocalcique modifié selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter un acide gem-biphosphonique ou l'un de ses sels de métal alcalin ou alcalino-terreux à une suspension
5 d'un composé phosphocalcique précurseur dans l'eau ultra-pure, à agiter le milieu réactionnel à température ambiante, puis en récupérer par centrifugation le composé formé.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le composé formé est purifié par lavage à l'eau ultra-
10 pure, suivi d'une filtration et d'un séchage à l'air à température ambiante.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le composé phosphocalcique précurseur est choisi parmi les orthophosphates de calcium ayant une solubilité dans
15 l'eau supérieure à 4.10^{-59} mol l⁻¹.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le composé phosphocalcique est choisi parmi le BCP, le CDA qui est une hydroxyapatite déficiente en calcium et le β -TCP.

20 14. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'agitation à température ambiante est maintenue pendant une durée entre 1 h et 72 h.

15. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les acides ou les sels utilisés comme composés gem-
25 biphosphoniques répondent à la formule (OY)(OX)P(O)-CR¹R²-P(O)(OX)(OY) dans laquelle X ou Y représentent indépendamment l'un de l'autre H ou un cation de métal alcalin ou alcalino-terreux, R¹ représente H, OH ou un halogène, et R² représente :

- 30
- un hydrogène ou un halogène,
 - un radical alkyle,
 - un radical aminoalkyle dans lequel le groupe amino porte éventuellement un substituant alkyle,
 - un radical alkylamino,

35

 - un radical alkyle portant un substituant aromatique comprenant au moins un atome N,
 - un radical alkyle portant un groupe thioéther aromatique.

16. Composition utilisable par injection pour le traitement d'ostéoporose ou de récurrences de tumeurs lytiques

par inhibition de l'activité ostéoclastique, caractérisée en ce qu'elle est constituée par une suspension du composé phosphocalcique modifié selon la revendication 1, dans une solution ou un gel biocompatible présentant une viscosité
5 permettant le transport de granules de taille comprise entre 40 μm et 500 μm .

17. Composition selon la revendication 16, caractérisée en ce que le gel biocompatible est un hydrogel d'intérêt biologique.

10 18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que le gel est un hydrogel dérivé de la cellulose ou un gel à base d'hyaluronate de sodium.

Fig. 1

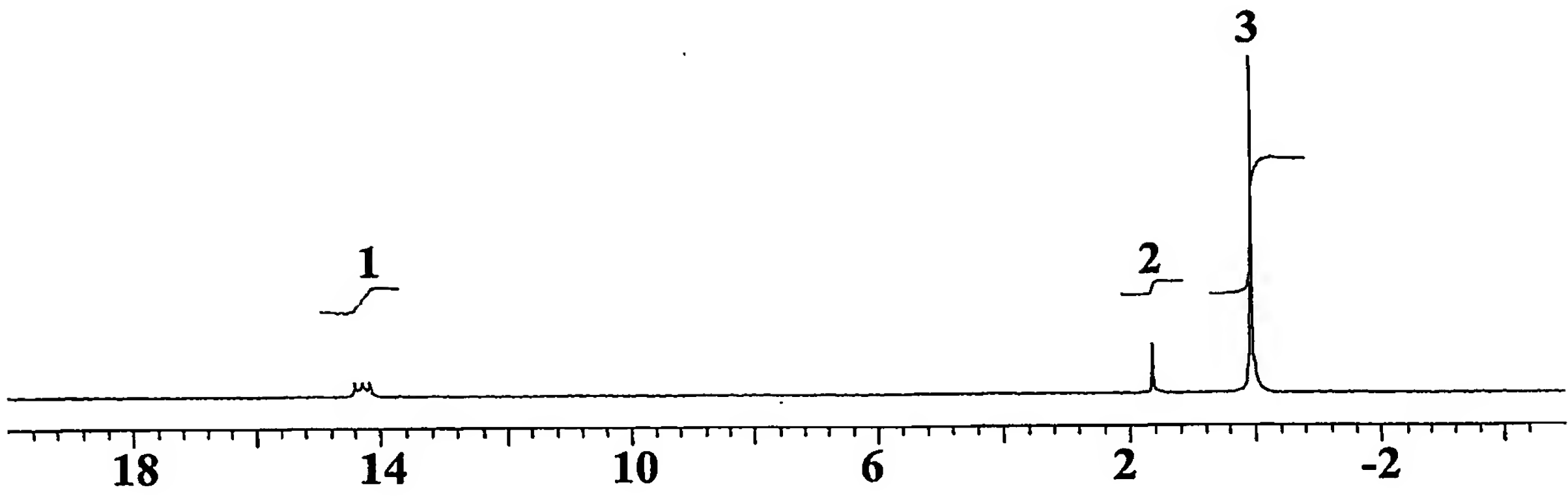


fig. 2

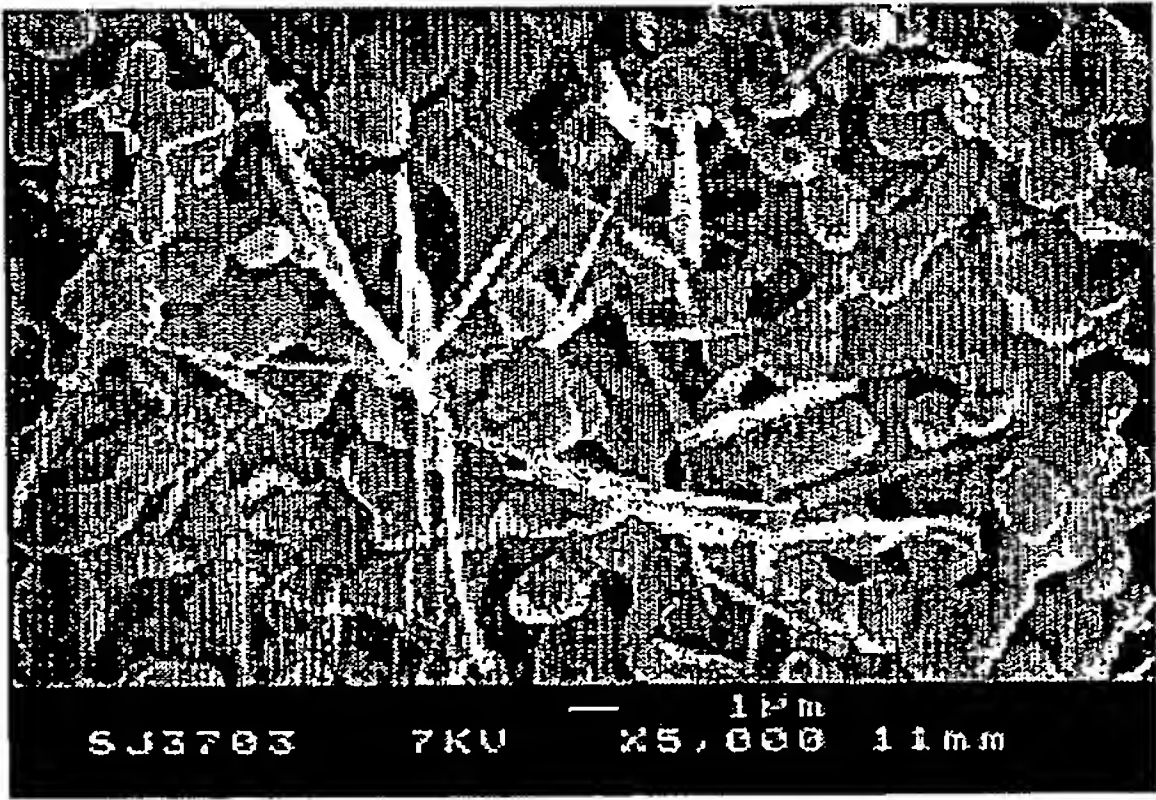


Fig. 3

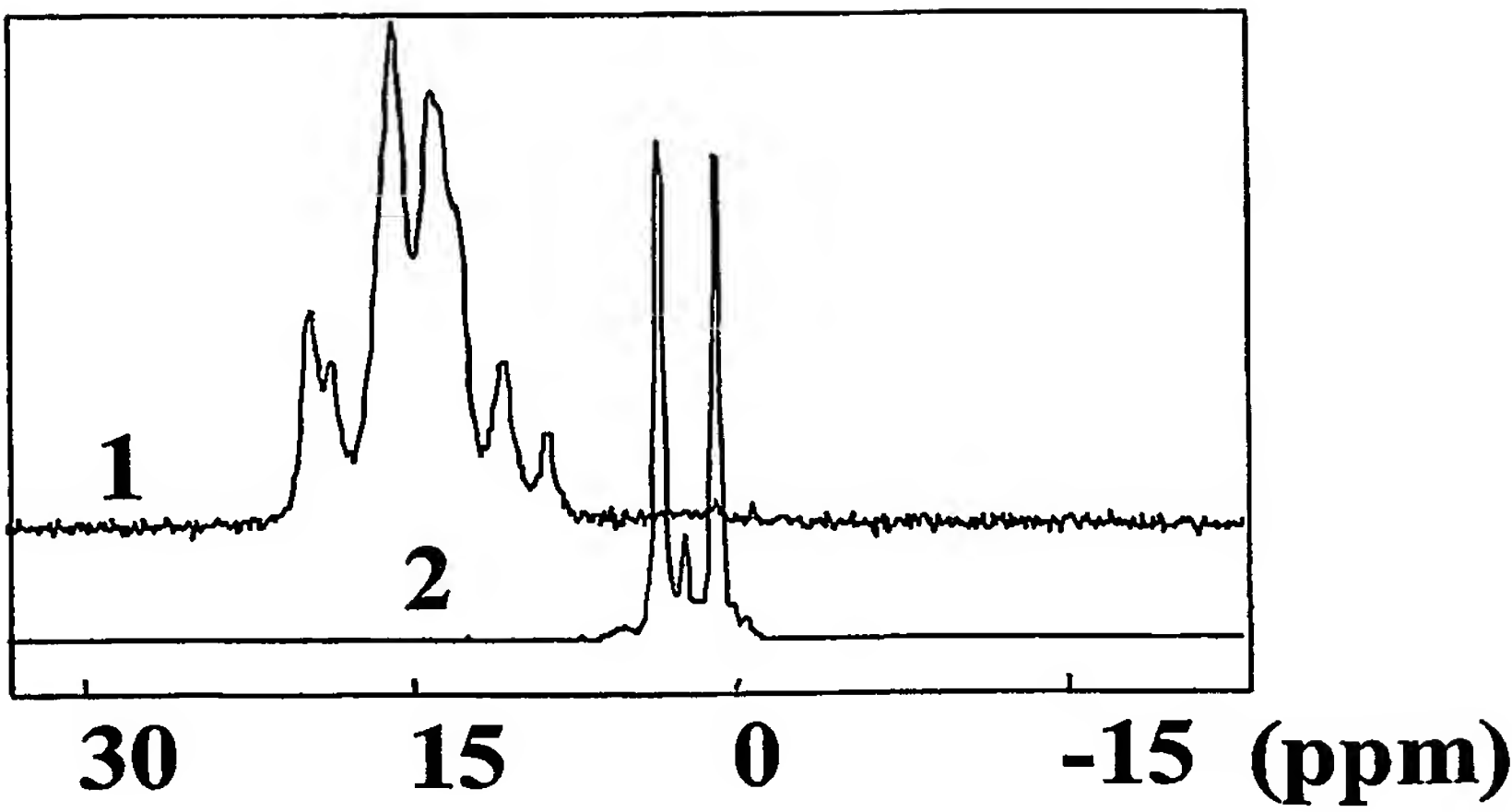


Fig. 4

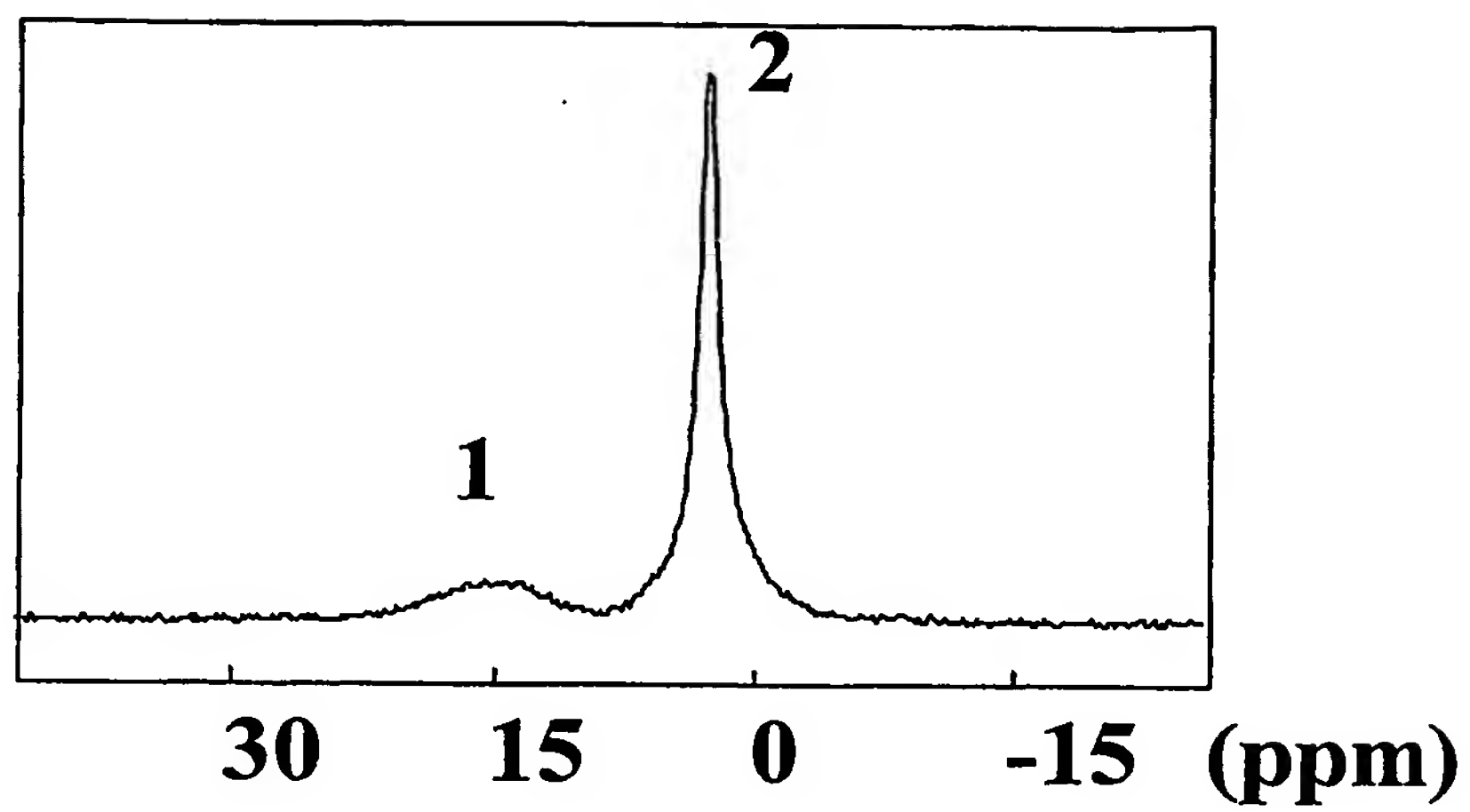


Fig. 5

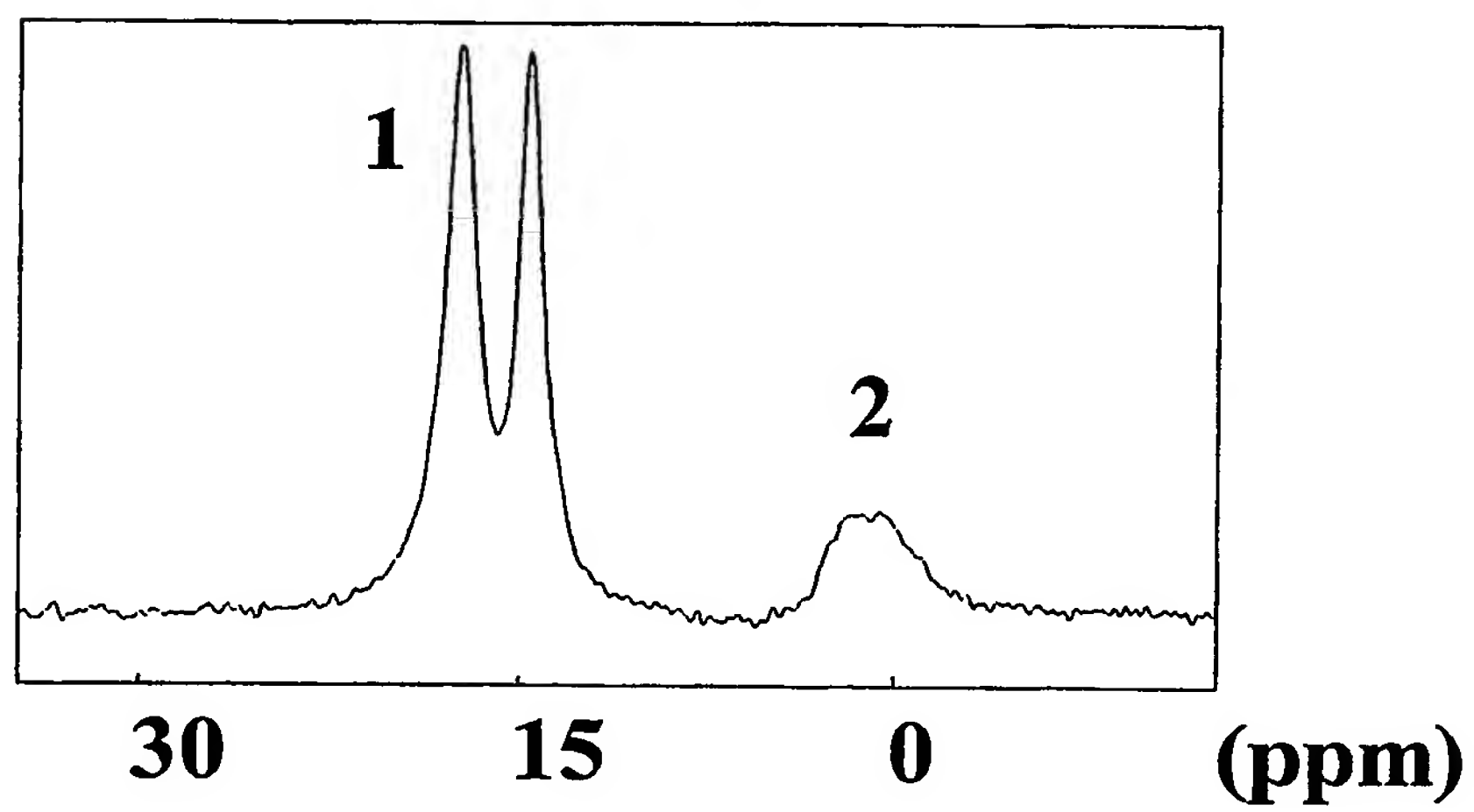
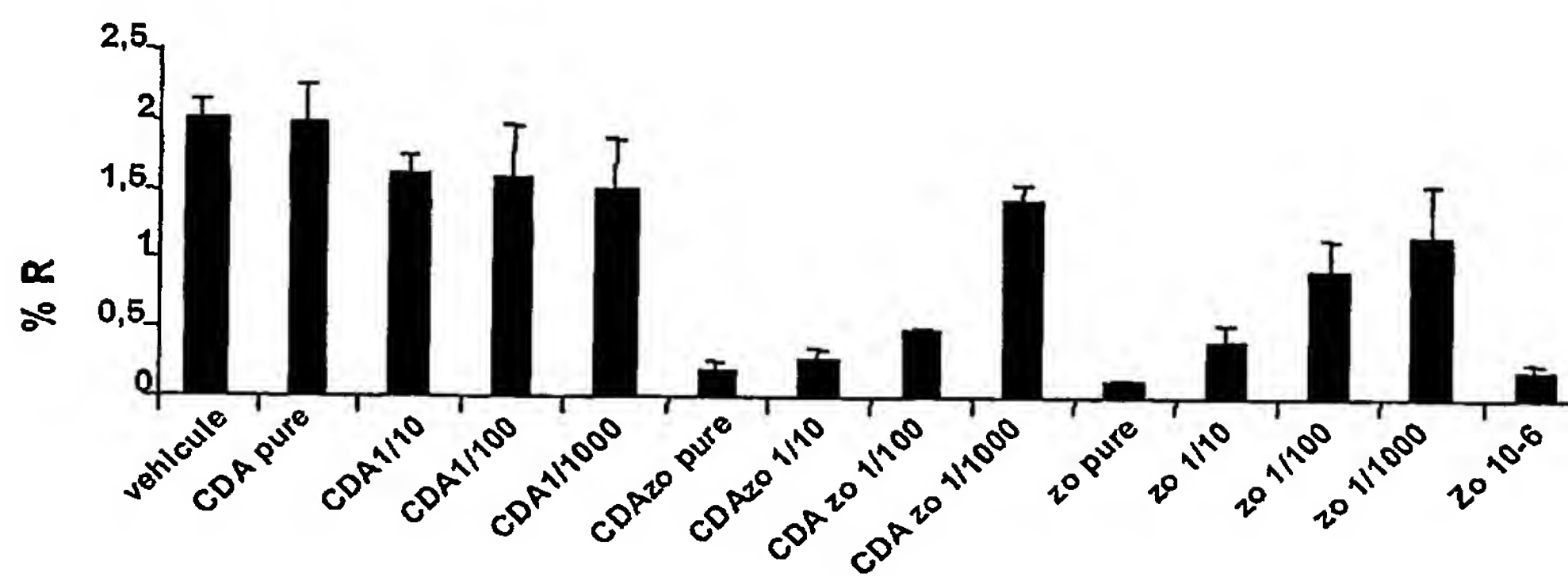


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

PCT/TK 03/00527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61L27/12 A61L27/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 47214 A (SLOAN KETTERING INST CANCER RES) 17 August 2000 (2000-08-17) page 3, line 4 - line 8 page 8, line 24 - line 34 page 9, line 12 - line 19 page 12, line 8 - line 22 page 19, line 13 - line 17 page 26, line 26 -page 32, line 27 ---	1-18
A	DENISSEN H ET AL: "CERAMIC HYDROXYAPATITE IMPLANTS FOR THE RELEASE OF BIPHOSPHONATE" BONE AND MINERAL, SHANNON, IE, vol. 25, no. 2, 1994, pages 123-134, XP001015353 --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2003

Date of mailing of the international search report

30/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ESPINOSA, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatⁿ Application No

PCT/FR 03/00527

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DENISSEN H ET AL: "Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants." JOURNAL OF PERIODONTOLOGY. UNITED STATES FEB 2000, vol. 71, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 279-286, XP008010275 ISSN: 0022-3492 cited in the application</p>	
A	<p>DENISSEN H ET AL: "Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal-like tissues." JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH. DENMARK JAN 1997, vol. 32, no. 1 Pt 1, January 1997 (1997-01), pages 40-46, XP008010473 ISSN: 0022-3484</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

International Application No

PCT/JP 03/00527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0047214	A	17-08-2000	
		AU 3358800 A	29-08-2000
		CA 2360319 A1	17-08-2000
		EP 1150684 A1	07-11-2001
		JP 2002536123 T	29-10-2002
		WO 0047214 A1	17-08-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00527

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61L27/12 A61L27/54

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 A61L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 00 47214 A (SLOAN KETTERING INST CANCER RES) 17 août 2000 (2000-08-17) page 3, ligne 4 - ligne 8 page 8, ligne 24 - ligne 34 page 9, ligne 12 - ligne 19 page 12, ligne 8 - ligne 22 page 19, ligne 13 - ligne 17 page 26, ligne 26 -page 32, ligne 27 ---	1-18
A	DENISSEN H ET AL: "CERAMIC HYDROXYAPATITE IMPLANTS FOR THE RELEASE OF BIPHOSPHONATE" BONE AND MINERAL, SHANNON, IE, vol. 25, no. 2, 1994, pages 123-134, XP001015353 --- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juillet 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/07/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ESPINOSA, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deman nationale No
PCT/FR 03/00527

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DENISSEN H ET AL: "Alveolar bone response to submerged bisphosphonate-complexed hydroxyapatite implants." JOURNAL OF PERIODONTOLOGY. UNITED STATES FEB 2000, vol. 71, no. 2, février 2000 (2000-02), pages 279-286, XP008010275 ISSN: 0022-3492 cité dans la demande</p> <p>---</p>	
A	<p>DENISSEN H ET AL: "Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal-like tissues." JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH. DENMARK JAN 1997, vol. 32, no. 1 Pt 1, janvier 1997 (1997-01), pages 40-46, XP008010473 ISSN: 0022-3484</p> <p>-----</p>	

Renseignements relatifs au :

bonnes familles de brevets

Demande internationale No

PCT/PA 03/00527

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)